При дальнейшем исследовании уровень антител к обеим инфекциям постепенно снижался и на 56 сутки (период исследования) составил 4,1875±1,1875 log_2 к вирусу ГП, а к вирусу НБ – 9,375±0,875 log_2. Исследованиями установлено, что среди ассоциированных экспериментальных вакцин наиболее эффективный иммунный ответ у птицы вызывает образец с антигенным соотношением 50/50 к возбудителям ГП и НБ.

Также следует отметить, что общее состояние иммунизированных цыплят в течение всего периода наблюдений было удовлетворительным. Физиологические показатели у привитых цыплят не отличались от таковых у птиц контрольной группы.

Выводы

Таким образом, можно заключить, что экспериментальные образцы инактивированных ассоциированных вакцин против ГП и НБ с различным соотношением антигенов индуцируют у вакцинированного поголовья образование высокого уровня специфических антител к вирусу гриппа птиц и болезни Ньюкасла.

Образец экспериментальной инактивированной ассоциированной вакцины против ГП и НБ с антигенным соотношением 50/50 обладает наибольшей антигенной активностью и может быть использован для дальнейшего изучения и возможности внедрения в ветеринарную практику.

РЕЗЮМЕ

В статье представлены результаты исследований динамики иммунного ответа у птиц после введения экспериментальных образцов вакцин против гриппа птиц (ГП) и болезни Ньюкасла (НБ). В опыте были использованы две моновалентные вакцины против ГП и НБ и три образца ассоциированных вакцин против ГП и НБ с антигенным соотношением 60/40, 50/50 и 70/30, соответственно. По результатам проведенных исследований было установлено, что образец вакцины с антигенным соотношением 50/50 обладает наибольшей антигенной активностью и может быть использован для дальнейшего изучения.

SUMMARY

In this paper the results of investigations aimed at studying the immune response dynamics in poultry after administration of the experimental vaccine against avian influenza and Newcastle disease are shown. Two monovalent vaccines against avian influenza and Newcastle disease and three samples of associated vaccines against avian influenza and Newcastle disease with the antigenic ratio of 60/40; 50/50 and 70/30, respectively, were used in the trial. The results of the trial suggest that the vaccine sample with the antigenic ratio of 50/50 possesses the greatest antigenic activity and can be used for further investigations.

Литература

1. Грипп: обзор литературы / Н.С. Дудникова, В.В. Дрыгин, Л.О. Щербакова, А.В. Андриясов. Владимир, 2005. 59 с.
2. Эпизоотология и инфекционные болезни сельскохозяйственных животных / А.А. Конопаткин, И.А. Бакулов, Я.В. Нуйкин [и др.]. М.: Колос, 1984. С. 457-466.
3. Swayne, D.E. Influenza / D.E. Swayne, D.A. Halvorson // Diseases of Poultry. 11th ed. Ames, Iowa, 2003. P. 135-160.
4. Highly pathogenic avian influenza // O.I.E. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. – Paris, 2004. Vol. 1. P. 258-269.
5. Mayo, M. A. Virus taxonomy-Houston 2002 / M. A. Mayo // Arch. Virol. 2002. Vol. 147. P. 1071-1076.

УДК 619:578.825.1: 57.082.26

Е.В. Курненкова, Ш.К. Куляшбекова, Е.А. Кудакова, А.В. Борисов, М.И. Шульпин, В.В. Дрыгин

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ШТАММА Md5 ВИРУСА БОЛЕЗНИ МАРЕКА НА РАЗЛИЧНЫХ КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК КУРИНЫХ ЭМБРИОНОВ

Введение

Для первичного выделения высоковирулентных вирусов болезни Марека (ВБМ) традиционно используют первичные культуры клеток почек куриных эмбрионов или цыплят, культуры фибробластов куриных или утиных эмбрионов. Наилучшие результаты получают на культурах клеток, приготовленных из тканей цыплят с генетически обусловленной высокой восприимчивостью к заражению вирусом болезни Марека [1, 3, 4, 6].

В 2006 году ФГУ «ВНИИЗЖ» был приобретен штамм Md5 высоковирулентного вируса болезни Марека (ввВБМ) из коллекции «Collection of animal viruses and an-

tisera, chlamidiae and rickettsiae» (США). С получением нового высоковирулентного штамма нам необходимо было изучить культуральные свойства данного вируса, чтобы в дальнейшем подобрать высокочувствительную модель культивирования .

Основной целью наших исследований являлось изучение культуральных свойств высоковирулентного вируса БМ на культурах клеток почек, печени и эпителия кожи куриных эмбрионов.

Материалы и методы

Вирусный материал. В работе мы использовали штамм Md5 ввВБМ, адаптированный к культуре клеток куриных фибробластов (КФ), с инфекционной активностью $3,0x10^5$ ФОЕ/$см^3$.

Культуры клеток. В наших исследованиях были использованы первично-трипсинизированные культуры клеток почек, печени и кожи СПФ-эмбрионов кур. В качестве контроля размножения и накопления использовали культуры клеток куриных фибробластов и субкультуры. Температура инкубации нормальных и зараженных клеточных культур равнялась 38,5±1°С.

Сроки культивирования зависели от целей работы и составили от 24 часов до 10 суток [2, 3].

Питательные среды и растворы. Основной средой для культивирования вируса БМ и клеток КФ, печени и кожи была смесь равных объемов сред: 199, Игла и 0,5% гидролизата лактальбумина на солевом растворе Эрла (ГЛАЭ). Для культивирования клеток почки использовали среду 199. Питательные ростовые среды содержали 10% эмбриональной сыворотки, а поддерживающие среды – в пределах 2–5%. Величина рН ростовой и поддерживающей среды была в пределах 6,9–7,2. Для трипсинизации тканей эмбрионов, а также для дезагрегации клеточных культур использовали 0,25% раствор трипсина, приготовленный по общепринятой методике.

Сосуды и аппараты. Лабораторное культивирование клеток и вируса проводили во флаконах емкостью 50 $см^3$ фирмы «Costar», а также в роллерных бутылях вместимостью 3 $дм^3$, диаметром 100 мм. Материал во флаконах культивировали стационарно, а для вращения сосудов использовали роллерный аппарат стеллажно–ярусного типа с барабанами на 12 бутылей со скоростью вращения 8–12 об/мин.

Определение инфекционной активности вируса. Для титрования штамма Md5 методом предельных разведений по Керберу использовали 24–30-часовую субкультуру клеток КФ. Вирус титровали в десятикратном разведении от 10^{-1} до 10^{-7}. Чтобы получить последовательное 10-кратное разведение, брали по 1,0 $см^3$ вирусной суспензии и последовательно вносили в пенициллиновые флаконы, содержащие по 9,0 $см^3$ питательной среды. Материалом каждого разведения заражали по 4 флакона с культурой путем внесения в поддерживающую среду по 1,0 $см^3$ соответствующего разведения суспензии инфицированных клеток в поддерживающей среде. В качестве контроля при титровании оставляли 4 флакона с незараженной культурой клеток.

Учет цитопатического действия вируса (ЦПД) проводили через каждые 24 часа, после инокуляции вирусом, до тех пор, пока в контрольной группе не наблюдалась тотальная дегенерация клеток.

Расчет вели по формуле:

$\mathbf{LgЭД_{50} = LgДn + d\ (\Sigma Li - 0,5)}$, где:

$Lg\ T_{50}$ – оценка искомого значения титра;

Lg Д – наибольшее разведение, при котором e/m = 1;

Lg K – величина шага разведений в 10-м, LgK = 1;

d – наименьшее разведение,e/m = 0;

K_{10} – десятикратный шаг.

Определение накопления вируса методом полимеразной цепной реакции. Наряду с титрованием для контроля размножения и количественного накопления вируса в исследуемых культурах клеток использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) на каждом пассажном уровне. Работы проводились сотрудниками лаборатории диагностики болезней птиц по разработанной ими методике [5].

Определение концентрации клеток. Клетки подсчитывали в камере Горяева, для чего 1,0 $см^3$ тщательно перемешанной суспензии вакцины разводили питательной средой или физиологическим раствором в 10 раз и к 1,0 $см^3$ клеточной взвеси добавляли равный объем 0,2%-го раствора трипановой сини. При применении данной методики живые клетки не окрашиваются, а мертвые окрашиваются в синий цвет. Подсчитывали только клетки, имеющие ядро и неповрежденную цитоплазму. Процент жизнеспособности клеток определяли по формуле:

$$\frac{\text{общее число клеток – число мертвых клеток}}{\text{общее число клеток}} \times 100$$

Результаты исследований

На первом этапе наших исследований проводили культивирование первично-трипсинизированных клеток почек, печени и кожи СПФ-эмбрионов кур. Для

Таблица

Результаты адаптации штамма Md5 ввВБМ к различным культурам клеток

№ пассажного уровня	Культура клеток КФ (контроль)			Культура клеток почек			Культура клеток эпителия кожи		
	данные ПЦР	инфек. акт.		данные ПЦР	инфек.акт.		данные ПЦР	инфек.акт.	
		ФОЕ/см³	Lg		ФОЕ/см³	Lg		ФОЕ/см³	Lg
1	23,3	$3,4x10^4$	4,53	23,0	$3,4x10^4$	4,53	19,2	$4,5x10^4$	4,65
2	23,0	$3.8x10^4$	4,57	23,3	$3,8x10^4$	4,57	20,4	$4,8x10^4$	4,68
3	21,5	$4.2x10^4$	6,23	24,41	$4,6x10^4$	4,66	21,6	$5,6x10^5$	5,74
4	19,0	$1.0x10^5$	5,0	28,45	$5,0x10^4$	4,69	19,5	$6,0x10^5$	5,77
5	17,0	$2.0x10^5$	5,3	35,68	$5,2x10^4$	4,71	18,0	$6,8x10^5$	5,83

изготовления культуры клеток почек и печени были использованы 17-суточные, а для кожи – 12-суточные СПФ-эмбрионы кур. С этой целью эмбрионы после овоскопирования помещали на 24 часа в холодильник (+4±1° С).

В асептических условиях яйцо вскрывали, извлекали тушку эмбриона и осуществляли отсечение головы. После умерщвления тело эмбриона фиксировали в положении спины на поверхности чашки Петри. Путем препарирования с эмбрионов по направлению к голове срезали кожный лоскут, затем вскрывали брюшную полость, и извлекали печень, а затем почки эмбриона [2].

Извлеченные ткани помещали в отдельные емкости, подвергали измельчению и промывали раствором Хенкса. В емкости с кусочками ткани вносили подогретый до 37±1° С 0,25% раствор трипсина. Диспергирование тканей печени, почек и кожи проводили дробным способом, т.е. по мере отхождения клеток собирали суспензию. После полного истощения ткани всю суспензию собирали, вносили 2% эмбриональной сыворотки КРС для нейтрализации действия трипсина и подвергали центрифугированию при 1000 об/мин в течение 20 минут. Затем надосадок удаляли, клетки ресуспендировали питательной средой и брали пробы для подсчета концентрации клеток. Для посева клеток почек использовали концентрацию 800±100 тыс. кл/см³, клеток печени – 1200±100 тыс. кл/см³, а для эпителия кожи – 700±100 тыс. кл/см³ [3, 6].

Для культивирования клеток почек и эпителия кожи использовали ростовую среду 199 с 10% эмбриональной сыворотки. Посев клеток печени проводили в ростовой среде, состоящей из равных частей среды 199, Игла и 0,5% гидролизата лактальбумина (ГЛА) с 10% эмбриональной сыворотки. За посеянными культурами клеток вели ежедневное наблюдение под микроскопом и оценивали рост клеток. При этом обнаружили, что через 48 часов во флаконах с клетками почек и кожи культуры сформировали полный монослой. Монослой почечной ткани состоял из полигональных клеток, тогда как в монослое клеток кожи преобладали фибробластоподобные клетки.

При посеве ткани печени на твердый субстрат через 24 часа, кроме гепатоцитов, прикреплялись в основном клетки соединительной ткани, которые при смене среды через сутки полностью удалялись. Клетки печеночной ткани на стекле формировали островки, которые через 48-72 часа начинали дегенерировать. Поэтому в дальнейшем работы по культивированию клеток печени и вируса в них были приостановлены, т.к., по-видимому, необходимо было освоить другой методический подход.

После освоения культивирования и получения полноценных клеток почек и эпителия кожи СПФ-эмбрионов кур провели их заражение штаммом Md5 ввВБМ в виде вируссодержащей клеточной суспензии. На первом пассаже, который длился 3 суток, цитопатических изменений (ЦПИ) под действием вируса не было обнаружено. Однако клетки сняли со стекла по общепринятой методике и использовали для проведения второго пассажа, т.е. провели «слепой» пассаж. На втором пассажном уровне через 48 часов появились первые признаки ЦПИ. Изменения в виде вакуолей обнаруживались по всему монослою, особенно четкое ЦПД было видно в клетках эпителия кожи. Через 72 часа провели третий пассаж аналогично первому.

На третьем пассаже ЦПИ под действием вируса на монослое культур клеток почек и кожи были видны в виде вакуолей или рефрактильных клеток по осевым (лучевым) линиям роста культуры. ЦПИ наблюдались через 72–96 часов после внесения вирусного материала и охватывали всю площадь клеточного монослоя. Через 5 суток вирусный материал в виде клеточ-

ной суспензии собрали по вышеописанной методике. Таким образом, провели 5 последовательных пассажей. Из материала каждого пассажного уровня брали пробы для подсчета концентрации вируссодержащих клеток, определения инфекционной активности и накопления вируса в ПЦР.

Результаты проведенных работ представлены в таблице: в процессе пассирования вируса на исследуемых культурах клеток наблюдается постепенное увеличение инфекционной активности вирулентного вируса на всех изучаемых культурах клеток эмбриона. Лучшие результаты получены с использованием культуры клеток эпителия кожи. Инфекционная активность вируса на пятом пассаже составила $6{,}8 \times 10^5$ФОЕ/см^3, что на один логарифм выше, чем на культуре клеток почек, и на 0,5 lg выше контрольных показателей. Эти данные подтверждают результаты, полученные в ПЦР – пороговое значение вируса достигло такого показателя, при котором он хорошо адаптирован к данной культуре клеток. Полученные данные указывают на то, что произошла адаптация штамма Md5 ВБМ к культурам клеток эпителия кожи СПФ-эмбрионов кур.

Необходимо отметить, что вирус в эпителиальных клетках кожи способен репродуцироваться и формировать более четкие фокусы, т.е. проходить полный цикл развития. При проведении последовательных пассажей вирулентного штамма Md5 ВБМ на культуре клеток почек наблюдается постепенное снижение порогового значения вируса в исследуемом материале. Это указывает на то, что в процессе пассирования вирус теряет адаптационные способности к ней.

Заключение

В результате проведенных работ штамм Md5 вв ВБМ был адаптирован к культурам клеток почек и эпителия кожи СПФ-эмбрионов кур. В процессе культивирования вируса наиболее яркие результаты по репродукции исследуемого вируса были получены на клетках эпителия кожи эмбриона кур, что подтверждено данными, полученными в ПЦР.

В результате проведенных работ установлено, что клетки эпителия кожи СПФ-эмбрионов кур обладают высокими ростовыми свойствами, просты в манипуляции и являются высокочувствительной моделью для изучения и первичного выделения высоковирулентного вируса от больной птицы.

РЕЗЮМЕ

Изучена возможность культивирования штамма Md5 высоковирулентного вируса болезни Марека в культурах клеток печени, почек и эпителия кожи куриных эмбрионов. Лучшие результаты были получены в клетках эпителия кожи, где на пятом пассажном уровне инфекционная активность вируса составила $6{,}8 \times 10^5$ФОЕ/см^3, что на один логарифм выше, чем на культуре клеток почек, и на 0,5 lg выше контрольных показателей.

SUMMARY

The possibility of cultivation of the highly virulent Marek disease virus Md45 strain in chicken embryo liver, kidney and skin epithelium cell cultures was studied. The best results were obtained using skin epithelium cells where the infectivity of the fifth passage virus was $6{,}8 \times 10^5$ FFU/cm^3. That was one lg higher than those in kidney cell culture and 0.5 lg higher than control values.

Литература

1. Вирусные болезни животных / В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Н.В. Фомина. М.: ВНИТИБП,1998. 928 с.
2. Волкова, О.В. Основы гистологии с гистологической техникой /О.В.Волкова, Ю.К. Елецкий. М.: Медицина, 1971. 271 с.
3. Культивирование вакцинных штаммов вируса болезни Марека /Ш.К. Куляшбекова, А.А. Гусев, В.И. Давыдова и др. //Пробл. инфекц. патологии с.-х. ж-ных: тез. докл. конф. Владимир, 1997. С. 145-146.
4. Курненкова, Е.В. Чувствительность культуры клеток утиных фибробластов к штамму «3004» вируса болезни Марек / Е.В. Курненкова, Ш.К. Куляшбекова //Актуал. вопр. зоотехнической науки и практики: мат. конф. Ставрополь, 2001. С. 396-399.
5. Методические указания по диагностике заболеваний сельскохозяйственных животных методом полимеразной цепной реакции / под ред. А.А. Гусева, А.Н. Панина. Владимир: ОКНИИ и МС ВНИИЗЖ, 1988. 519 с.
6. Schat, K.A. Isolation of Marek's disease virus revisited / K.A. Schat //Avian Pathol. 2005. Vol. 34. P. 91-95.